

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

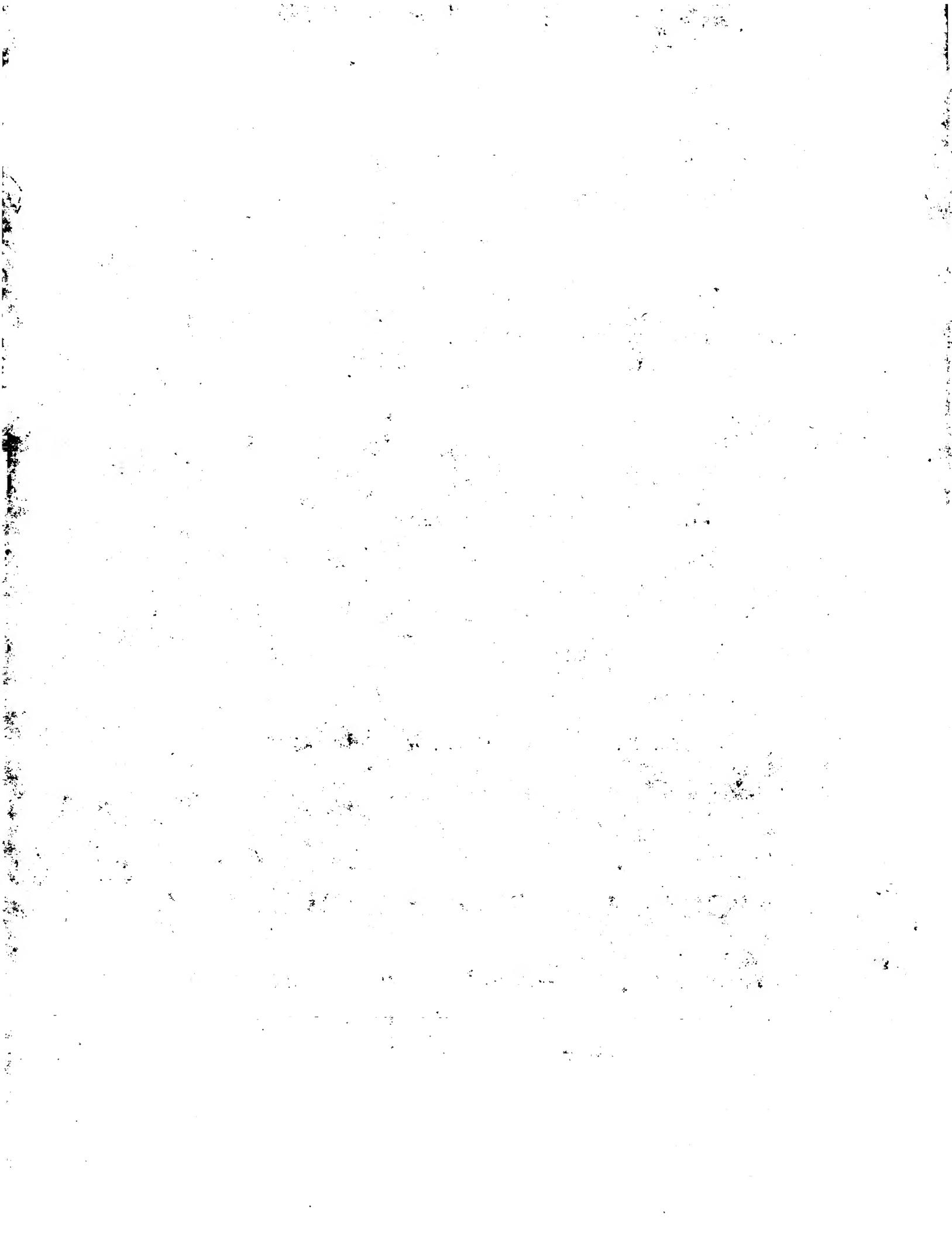
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/48518 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. September 1999 (30.09.99)
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP99/01996	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum:	24. März 1999 (24.03.99)	
(30) Prioritätsdaten:	198 12 941.6 24. März 1998 (24.03.98) DE	Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>):	MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, D-82152 Martinsried (DE).	
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>):	BURGER, Alexander [DE/DE]; Im Mittelpfad 11, D-55411 Bingen am Rhein (DE). HALLEK, Michael [DE/DE]; Brunnenstrasse 40, D-86938 Schondorf (DE).	
(74) Anwalt:	BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).	

(54) Title: MEDICAMENT FOR PREVENTING OR TREATING PAPILLOMA VIRUS-SPECIFIC TUMORS

(54) Bezeichnung: ARZNEIMITTEL ZUR VERMEIDUNG ODER BEHANDLUNG VON PAPILLOMAVIRUS-SPECIFISCHEM TUMOR

(57) Abstract

The invention relates to a medicament for preventing or treating human papilloma virus (HPV)-specific tumors containing at least one fusion protein and optional suitable additives and/or auxiliary agents. Said fusion protein is comprised of at least one L1-protein of one or more papilloma viruses, and is also comprised of at least one E-protein of one or more papilloma viruses, whereby the fusion protein does not contain any papilloma virus non-specific epitopes.

(57) Zusammenfassung

Arzneimittel zur Vermeidung oder Behandlung von humanem Papillomavirus (HPV)-spezifischem Tumor enthaltend mindestens ein Fusionsprotein aus mindestens einem L1-Protein eines oder mehrerer Papillomaviren und mindestens einem E-Protein eines oder mehrerer Papillomaviren und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe, wobei das Fusionsprotein keine Papillomavirus-unspezifischen Epitope enthält.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Leitland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolci	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Arzneimittel zur Vermeidung oder Behandlung von Papillomavirus-spezifischem Tumor

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Arzneimittel zur Vermeidung oder Behandlung von humanem Papillomaviren (HPV)-spezifischem Tumor enthaltend mindestens ein Fusionsprotein aus mindestens einem L1-Protein eines oder mehrerer Papillomaviren und mindestens einem E-Protein eines oder mehrerer Papillomavirien und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe, wobei das Fusionsprotein keine Papillomavirus-unspezifischen Epitope enthält.

Die Papillomaviren, auch Warzenviren genannt, sind doppelsträngige DNA-Viren mit einer Genomgröße von etwa 8000 Basenpaaren und einem Ikosaeder-förmigen Kapsid mit einem Durchmesser von ca. 55 nm. Bis heute sind mehr als 100 verschiedene humane Papillomavirustypen bekannt, von denen einige, z.B. HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-39, HPV-45, HPV-52 oder HPV-58, bösartige Tumore und andere, z.B. HPV-6, HPV-11 oder HPV-42, gutartige Tumore verursachen können.

Elektronenmikroskopische Analysen von BPV-1 und HPV-1 ergaben, daß die Viren aus 72 pentameren Capsomeren aufgebaut sind, die wiederum aus fünf L1-Molekülen bestehen (Baker, T. et al. (1991) Biophys. J., 60, 1445).

Das Genom der Papillomaviren läßt sich in drei Bereiche unterteilen: Der erste Bereich betrifft eine nicht-kodierende Region, die Regulationselemente für die Transkription und Replikation des Virus enthält. Die zweite Region, sogenannte E-(Early)Region enthält verschiedene Protein-kodierende Abschnitte E1-E7, von denen z.B. das E6-Protein und das E7-Protein für die Transformation von Epithelzellen verantwortlich ist und das E1-Protein die DNA-Kopienzahl kontrolliert. Bei der E6- und E7-Region handelt es sich um sogenannte Onkogene,

die auch in bösartig entarteten Zellen exprimiert werden. Die dritte Region, auch L-(Late)Region genannt, enthält zwei Protein-kodierende Abschnitte L1 und L2, die für Strukturkomponenten des Viruscapsids kodieren. Das L1-Protein ist zu über 90% im viralen Capsid vorhanden, wobei das Verhältnis von L1:L2 im allgemeinen 30:1 ist.

HPV-6 und HPV-11 werden u.a. für Genitalwarzen verantwortlich gemacht, einige Papillomavirustypen wie HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-39, HPV-45, HPV-52 und HPV-58 sind mit bösartigen Tumoren des anogenitalen Traktes assoziiert. In über 50% der Fälle wird HPV-16 mit dem Gebärmutterhalskrebs (Cervixcarcinom) in Verbindung gebracht. HPV-16 ist daher der Hauptrisikofaktor für die Ausbildung von cervicalen Neoplasien. Daneben spielt das Immunsystem eine wichtige Rolle beim Fortschritt der Krankheit. So sind vermutlich zelluläre Immunantworten und insbesondere Antigen-spezifische T-Lymphozyten wichtig für den Abwehrmechanismus. Es wurde weiterhin gefunden, daß in hochgradigen cervicalen intraepithelialen Neoplasien (CIN II/III) und cervicalem Tumor das E7-Gen konstitutiv in allen Schichten des infizierten Epithels exprimiert wird. Daher wird das E7-Protein als potentielles Tumoranogen und als Zielmolekül für aktivierte T-Zellen betrachtet (siehe z. B. WO93/20844). Die E7-induzierte zelluläre Immunantwort im Patienten ist aber anscheinend nicht stark genug, um den Krankheitsverlauf zu beeinflussen. Die Immunantwort kann eventuell durch geeignete Impfstoffe verstärkt werden.

Es konnte nun gezeigt werden, daß die Expression des L1-Gens bzw. die Coexpression des L1- und L2-Gens Virus-ähnliche Partikel (VLPs) bildet. Die VLPs konnten zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern in verschiedenen tierischen Systemen verwendet werden. Die Bildung von virus-neutralisierenden Antikörpern ist jedoch von geringerer klinischer Bedeutung, wenn die Virusinfektion bereits stattgefunden hat, da für die Eliminierung virus-infizierter Zellen eine virus-spezifische zytotoxische T-Zell(CTL)-Antwort notwendig zu sein scheint. Es wurden daher sogenannte chimäre Papillomavirus-ähnliche Partikel (CVLPs) entwickelt, die aus einem chimären L1-E7-Protein bestehen (Müller, M. et al. (1997) Virology, 234, 93): Einige CVLPs induzieren eine E7-spezifische

CTL-Antwort in Mäusen, obwohl Experimente fehlschlugen, Antikörper durch Immunisieren von Mäusen mit CVLPs gegen E7 zu induzieren (Müller, M. et al. (1997), *supra*). Des weiteren scheinen neutralisierende Antikörper von HPV-assoziierten Erkrankungen in Patienten die Immunantwort auf verabreichtes L1-Protein zu limitieren (Müller, M. et al. (1997), *supra*). CVLPs sind jedoch für die Entwicklung eines Impfstoffes nach wie vor interessant, da die über MHC-Moleküle der Klasse I-präsentierten E7-Proteine von Tumorzellen Zielmoleküle von CTLs darstellen würden.

10 Peng et al. (1998) *Virology*, 240, 147 beschreiben nun CVLPs bestehend aus C-terminal verkürztem L1 des Rinderpapillomvirus (BPV) und HPV-16E7₄₉₋₅₇, welche nach Impfung von C57Bl/6-Mäusen E7-spezifische zytotoxische T-Zellen induzieren und vor dem Auswachsen E7-exprimierender Tumore schützen. Greenstone et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 1800 beschreiben CVLPs bestehend aus HPV-16L1 plus HPV-16L2 fusioniert mit dem Vollängen HPV-16E7-Protein, welche nach Immunisierung von C57Bl/6-Mäusen vor dem Auswachsen epithelialer E7-exprimierender Tumorzellen schützen, wobei jedoch zytotoxische T-Zellen nicht nachgewiesen wurden und somit die Induktion der Immunantwort weniger effizient erscheint.

20

Die Herstellung von VLPs bzw. CVLPs erfolgt im allgemeinen gentechnisch durch Expression der entsprechenden Gene kodierend für ein oder mehrere L-Proteine bzw. L- und E-Proteine in geeigneten Expressionssystemen. Die entsprechenden Gene sind beispielsweise bei Kirnbaum, R. et al. (1994) *J. Virol.*, 67, 6929-6936 beschrieben bzw. über die EMBL-Datenbank erhältlich. Die Zugangsnummern lauten z.B. für HPV18: PAPHPV18; für HPV31: PAPPH31; für HPV33: PAPPH33 oder für HPV58: PAPPH58.

30 Geeignete Expressionssysteme sind beispielsweise gentechnisch veränderte Hefen, z.B. *Saccharomyces* (*cerevisiae*), *Pichia* (*pastoris*), *Kluyveromyces* (*lactis*), *Schizosaccharomyces* (*pombe*) oder *Hansenula* (*polymorpha*) (Carter, J. J. et al. (1991), *Virology*, 182, 513), Insektenzellen, wie z.B. *Trichoplusia ni* High Five (siehe z.B. Müller et al. (1997), *supra*) oder prokaryotische Zellen (siehe z.B. WO

96/11272). Bei der Herstellung der Partikel in prokaryotischen Zellen fallen diese im allgemeinen in der Zelle aus und bilden sogenannte Einschlußkörperchen (Inclusion Bodies), die anschließend renaturiert und in Lösung gebracht werden müssen. Für die Verwendung der gentechnisch hergestellten Partikel bzw. Capside oder deren Vorstufen, den sogenannten Capsomeren, sind nach der Expression weitere Reinigungsschritte notwendig.

Ein entscheidender Nachteil der in der Literatur beschriebenen Wirkstoffe gegen HPV ist jedoch, daß sie zum einen nur eine geringe Wirkung zeigen und zum anderen bis heute keine wirksame Immuntherapie von Papillomavirus-spezifischem Tumor gezeigt werden konnte.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein Arzneimittel bereitzustellen, mit dem wirksam humaner Papillomavirus-spezifischer Tumor vermieden bzw. behandelt werden kann, das einfach hergestellt werden kann und das für die Zulassung als Arzneimittel geeignet erscheint.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß das erfundungsgemäße Arzneimittel gegen HPV-spezifischen Tumor wirksam ist.

20

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Arzneimittel zur Vermeidung oder Behandlung von humanem Papillomavirus (HPV)-spezifischem Tumor enthaltend mindestens ein Fusionsprotein aus mindestens einem L1-Protein eines oder mehrerer Papillomaviren und mindestens einem E-Protein eines oder mehrerer Papillomaviren und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe, wobei das Fusionsprotein keine Papillomavirus-unspezifischen Epitope enthält.

Unter Papillomavirus-unspezifische Epitope im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man im allgemeinen Epitope im Fusionsprotein, die durch einen Fremdproteinanteil, durch post-translationale Modifikationen oder durch eine Fehlfaltung der Papillomavirus-spezifischen Proteine verursacht werden.

Die Papillomavirus-unspezifischen Epitope sind beispielsweise eine Ursache dafür, daß zwar neutralisierende Antikörper oder CTL-Immunantworten induziert werden, jedoch ein Papillomavirus-spezifischer Tumor nicht wirksam vermieden bzw. bekämpft werden kann, da durch unspezifische Antikörper oder CTLs die immunologische Wirkung abgeschwächt wird oder immunologische Nebenwirkungen die Wirkung des eigentlichen Wirkstoffes stören.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel wirkt vorzugsweise zur Vermeidung oder Behandlung von gutartigem oder bösartigem Tumor, insbesondere von Larynx-, Cervix-, Penis-, Vulva- oder Analcarcinom, einschließlich deren Vorstufen, wie z.B. hochgradige CIN (cervikale intraepitheliale Neoplasie).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße Arzneimittel kein Adjuvans, d.h. keine Substanz, die die Immunität des Papillomavirus-spezifischen Proteins verstärkt, da insbesondere die Anwesenheit eines L-Proteins vor allem von L1 die Immunität bereits ausreichend verstärkt. Diese Eigenschaft ist insbesondere bei der Zulassung als Arzneimittel oder Diagnostikum von Vorteil, da die einzigen von den Zulassungsbehörden zugelassenen immunstimulierenden Materialien zur Zeit Aluminiumsalze sind. Zudem werden durch das Weglassen von Adjuvantien und/oder anderen Hilfs- bzw. Zusatzstoffen nicht erwünschte Nebenwirkungen vermieden.

Wie bereits oben erwähnt ist ein weiteres wesentliches Problem bei der Verwendung von Capsiden und Capsomeren als Arzneimittel deren schlechte Löslichkeit. So neigen beispielsweise Capside oder Capsomere von HPV-16 zur Aggregation, wodurch die Löslichkeit wesentlich verringert wird. Die zum Teil geringe Löslichkeit der Capside bzw. Capsomere führt nicht nur zu einem Verlust an Ausbeute, sondern auch zu einer erschwerten Anwendung als Arzneimittel.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße Arzneimittel daher als einen geeigneten Zusatz- oder Hilfsstoff ca. 0,3 bis ca. 4 M, vorzugsweise ca. 0,4 bis ca. 3 M, insbesondere ca. 0,5 bis 2 M, vor allem ca. 1 bis ca. 2 M eines Salzes mit einem pH-Wert von ca. 7,3 bis ca. 7,45, vorzugsweise ca. 7,4.

Der Vorteil dieser Salzlösung ist, daß das Fusionsprotein in Lösung bleibt bzw. fein verteilt als Suspension vorliegt, d.h. es bleiben im allgemeinen mehr als ca. 90%, vor allem mehr als ca. 95% des Fusionsproteins in Lösung und fallen auch nicht für einen Zeitraum von mindestens ca. 12 Stunden aus. Auch ist das Fusionsprotein durch Zentrifugation bei maximal 5000 g nicht wesentlich sedimentierbar.

Das Salz ist im allgemeinen ein Alkali- oder Erdalkalisalz, vorzugsweise ein Halogenid oder Phosphat, insbesondere ein Alkalihalogenid, vor allem NaCl und/oder KCl. Die Verwendung von NaCl ist insbesondere für die Herstellung einer pharmazeutischen Formulierung bevorzugt.

Der pH-Wert des Arzneimittels wird im allgemeinen mit einem geeigneten organischen oder anorganischen Puffer eingestellt, wie z.B. vorzugsweise mit einem Phosphat-Puffer, Tris-Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), HEPES-Puffer ([4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure) oder MOPS-Puffer (3-Morpholino-1-propansulfonsäure). Die Auswahl des jeweiligen Puffers richtet sich im allgemeinen nach der gewünschten Puffermolarität. Phosphatpuffer ist beispielsweise für Injektions- und Infusionslösungen geeignet.

Als weitere Zusatz- und/oder Hilfsstoffe, die beispielsweise zur weiteren Stabilisierung des Papillomavirus-spezifischen Proteins in dem erfindungsgemäßen Arzneimittel dienen, eignen sich beispielsweise Detergentien, wie z.B. Triton-X-100 oder Natriumdesoxycholat, aber auch Polyole, wie z. B. Polyethylenglykol oder Glycerin, Zucker, wie z. B. Saccharose oder Glukose, zwitterionische Verbindungen, wie z. B. Aminosäuren wie Glycin oder insbesondere Taurin oder Betain und/oder ein Protein, wie z. B. bovines oder humanes Serumalbumin. Bevorzugt sind Detergentien, Polyole und/oder zwitterionische Verbindungen. Andere Zusatz- und/oder Hilfsstoffe sind Proteaseinhibitoren, wie z.B. Aprotinin, ϵ -Aminocapronsäure oder Pepstatin A. Bevorzugt sind solche Zusatzstoffe, die keine immunologischen Nebenwirkungen induzieren.

Unter den Begriffen L1/L2-Protein und E-Protein versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung sowohl die Vollängen-Proteine wie auch deren Mutanten, wie z. B. Deletionsmutanten.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße Fusionsprotein ein deletiertes L-Protein, vorzugsweise ein deletiertes L1- und gegebenenfalls L2-Protein. Die Deletion hat den Vorteil, daß in den deletierten Bereich besonders wirksam andere Proteine, beispielsweise Papillomavirus-spezifische E-Proteinsequenzen eingefügt werden können, wodurch sich der Anwendungsbereich der erfindungsgemäßen Zusammensetzung erweitern läßt. Insbesondere bevorzugt ist ein L-Protein mit einer C-terminalen Deletion und insbesondere ein C-terminal deletiertes L1-Protein. Die C-terminale Deletion hat den Vorteil, daß die Effizienz der Bildung virus-ähnlicher Partikel gesteigert werden kann, da das am C-Terminus lokalisierte nukleäre Lokalisationssignal deletiert ist. Die C-terminale Deletion beträgt daher vorzugsweise bis zu ca. 35 Aminosäuren, insbesondere ca. 25 bis ca. 35 Aminosäuren, vor allem ca. 32 bis 34 Aminosäuren. Beispielsweise ist eine 32 Aminosäuren lange C-terminale Deletion des HPV-16 L1-Proteins ausreichend, um die Bildung von virusähnlichen Partikeln um das mindestens ca. zehnfache steigern zu können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist auch das E-Protein deletiert, vor allem das E6- und/oder E7-Protein. Insbesondere ist es bevorzugt, wenn der C-terminale Teil des E-Proteins deletiert ist, vorzugsweise der C-terminale Teil des E7-Proteins, da diese Konstrukte in Verbindung mit deletiertem L-Protein bevorzugt Capsomere und/oder Capside ausbilden können. Insbesondere bevorzugt sind Deletionen bis zu 55 Aminosäuren, vorzugsweise ca. 5 bis ca. 55 Aminosäuren, insbesondere ca. 32 bis ca. 43 Aminosäuren.

Ein besonders bevorzugtes Konstrukt ist beispielsweise E7 mit den N-terminalen Aminosäuren 1 bis ca. 60, da dieses Konstrukt ein Maus-Epitop zur Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten enthält, welches im Bereich der Aminosäuren 49-57 lokalisiert ist. Ein anderes bevorzugtes Konstrukt ist E7 mit den N-terminalen Aminosäuren 1 bis ca. 55, welches in Verbindung mit deletiertem L-

Protein Capsomere und Capside bevorzugt bildet, da dieses Konstrukt E7-spezifische Sequenzen im Bereich der Aminosäuren 56-70 nicht enthält, welche die Bildung von Capsiden stören können. Besonders bevorzugt ist ein um 32 Aminosäuren C-terminal deletiertes L1-Protein von HPV-16, welches mit einem E7-Protein von HPV-16 mit den Aminosäuren 1-55 oder 1-60 verbunden ist. Diese Konstrukte induzieren nicht nur neutralisierende Antikörper oder eine spezifische CTL-Antwort, sondern verhindert einerseits die Bildung von Tumoren und verursachen andererseits einen Rückgang von bereits bestehenden Tumoren im Tierexperiment. Vor allem E7 mit den Aminosäuren 1-60 zeigt eine deutliche prophylaktische wie auch therapeutische Wirkung bei Tumoren. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist daher ein L1ΔE7_{1-x}-Fusionsprotein, vorzugsweise in Form eines CVLPs, insbesondere von HPV16, wobei x eine ganze Zahl von 55 bis einschließlich 60 bedeutet, und insbesondere ein L1ΔE7₁₋₅₅- oder L1ΔE7₁₋₆₀-Fusionsprotein.

15

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auch auf die Verwendung der erfindungsgemäßen Konstrukte zur Herstellung eines Arzneimittels einerseits zur Verbindung von HPV-spezifischen Tumoren und andererseits zur Regression von bereits bestehenden HPV-spezifischen Tumoren.

20

Zur Herstellung eines sowohl prophylaktisch wie auch therapeutisch wirksamen Arzneimittels ist es bevorzugt, wenn das beschriebene Papillomavirus-spezifische Fusionsprotein in Form eines Capsids und/oder Capsomers vorliegt, da durch die Capside und/oder Capsomere und insbesondere durch den Anteil von L-Protein die Immunreaktion noch deutlich gesteigert werden kann. Als Fusionsproteine, die zur Capsid- und/oder Capsomerbildung geeignet sind, sind daher beispielsweise Fusionsproteine aus deletiertem L1 und E7, E6 und/oder E1 bevorzugt.

Capside sind im Sinne der vorliegenden Erfindung virale oder virus-ähnliche Strukturen in einer im allgemeinen ikosaedrischen Form, die im allgemeinen aus 72 Capsomeren aufgebaut sind.

Capsomere sind im Sinne der vorliegenden Erfindung assemblierte Proteine enthaltend mindestens ein Papillomavirus-Strukturprotein, vorzugsweise L1 oder Deletionen von L1. Beispielsweise können 5 erfindungsgemäße Fusionsproteine zu einem Capsomer assemblieren, die wiederum zu einem Capsid assemblieren können.

Für die Herstellung eines humanen Arzneimittels sind für die beschriebenen Konstrukte Proteine bzw. Peptide des humanen Papillomavirus (HPV) und vorzugsweise von HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-52 und/oder HPV-58, insbesondere HPV-16, HPV-18, HPV-31 und/oder HPV-45 geeignet. Vor allem für die Herstellung einer KombinationsVakzine ist es vorteilhaft, Proteine bzw. Peptide aus verschiedenen HPV-Typen zu kombinieren, beispielsweise eine Kombination von HPV-16 und HPV-18 bzw. HPV-18, HPV-31, HPV-45 und HPV-58 im Falle von z. B. Cervixcarcinom oder HPV-6 und HPV-11 im Fall von z. B. Condylomen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Arzneimittels, bei dem eine geeignete Zelle enthaltend einen geeigneten Expressionsvektor, der für das genannte Fusionsprotein kodiert, unter geeigneten Bedingungen kultiviert, das Expressionsprodukt isoliert wird und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe zugesetzt werden.

Die Expressionsvektoren können beispielsweise prokaryotische oder eukaryotische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in E. coli z.B. die Vektoren pGEM oder pUC-Derviate (siehe z. B. WO96/11272). Beispiele für eukaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in Saccharomyces cerevisiae z. B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767-5768, Carter, J. J. et al. (1991) supra) und für die Expression in Insektenzellen z. B. Baculovirus-Vektoren, insbesondere das Autographa Californica-Virus, wie in EP-B1-0 127 839 oder EP-B1-0 549 721 offenbart (siehe z. B. auch WO94/20137), und für die Expression in Säugerzellen z. B. die Vektoren Rc/CMV und Rc/RSV oder SV40-

Vektoren, welche alle allgemein erhältlich sind: Es eignen sich jedoch auch kommerziell erhältliche Baculovirus Expressionssysteme wie z. B. der Baculo Gold™ Transfection Kit von Pharmingen oder das Bac-to-Bac™ Baculovirus Expressionssystems von Gibco BRL. Weitere geeignete Expressionssysteme sind rekombinante Vaccinia-Viren (siehe z. B. WO 93/02184)

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die jeweilige Wirtszelle geeignete Promotoren, wie z. B. den trp-Promotor für die Expression in E. coli (siehe z. B. EP-B1-0 154 133), den ADH2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), J. Biol. Chem. 258, 2674-2682), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (siehe z. B. EP-B1-0 127 839 oder U.S. 5,004,687) oder den frühen SV40 Promotor oder LTR-Promotoren z. B. von MMTV (mouse mammary tumour virus; Lee et al. (1981) Nature 214, 228-232).

15

Als Wirtszellen eignen sich beispielsweise die E. coli Stämme DH5, HB101 oder BL21, die Hefestämme Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Schizosaccharomyces oder Hansenula (Carter, J. J. et al. (1991), Virology, 182, 513), die Insektenzelllinie Lepidopteran, z. B. von Spodoptera frugiperda, Trichoplusia ni, Rachiplusia ou oder Galleria Mellonela oder die tierischen Zellen COS, C127, Vero, 293 und HeLa, die alle allgemein erhältlich sind (siehe z. B. WO94/00152).

25

Die kodierenden Nukleinsäuren für die einzelnen Papillomavirus-spezifischen Proteine können beispielsweise über eine PCR(„polymerase chain reaction“)-Amplifizierung aus einer Genbank isoliert und kloniert werden. Beispielsweise ist das Genom von BPV-1 unter der GenBank Accession No. X02346 oder HPV-16 unter der GenBank Accession No. K02718 allgemein erhältlich. Eine HPV-16 L1-Sequenz ist beispielsweise auch in WO94/05792 offenbart. Die Sequenz des 98 Aminosäure-langen HPV16 E7-Proteins ist beispielsweise bei Seedorf et al. (1985) Virology, 145, 181-185 beschrieben. Eine andere Methode, die gewünschten Nukleinsäuren zu erhalten, ist, die Papillomavirus-spezifischen Gene direkt aus Warzen oder Tumore mittels PCR zu isolieren. Geeignete Primer für die E6- und

E7-Gene aus HPV-16 und HPV-18 sind z. B. in WO93/21958 offenbart. Weitere Literaturstellen für die gewünschten Nukleinsäuren sind beispielsweise Kirnbaum, R. et al. (1994), supra bzw. die oben bereits erwähnten in der EMBL-Datenbank hinterlegten Klone.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Expressionsvektor so konstruiert, daß das exprimierte Fusionsprotein um keine weiteren, durch den Vektor verursachte Aminosäuren verlängert ist. Dies wird beispielsweise dadurch erreicht, daß durch Mutagenese in einer PCR-Reaktion mittels geeigneter Primer-
10 Oligonucleotide unerwünschte Nucleotide, die für zusätzliche Aminosäuren kodieren, entfernt werden (Ho et al. (1989) Gene, 77, 51-59). Auf diese Weise erhält man ein Fusionsprotein, welches frei von zusätzlichen Aminosäuren und somit frei von möglicherweise zusätzlichen Fremdpeptopen ist, die immunologische Nebenreaktionen bewirken können.

Nach der Expression des beschriebenen Fusionsproteins ist es bevorzugt, dieses weiter zu reinigen bzw. zu renaturieren. Beispiele von chromatographischen Reinigungsverfahren finden sich Hjorth, R. & Moreno-Lopez, L. (1982) J. Virol. Meth., 5, 151; Nakai, Y. et al. (1987) J. Gen. Virol., 68, 1891; Hofmann, K. J. et
20 al. (1995) Virology, 209, 506; Rose, R. C. et al. (1993) J. Virol., 67, 1936, Sasagawa, T. et al. (1995) Virology, 206, 126 oder WO 95/31532..

Im allgemeinen kann das Arzneimittel oral, parenteral, wie z.B. subcutan, intramuskulär oder über die Schleimhaut, in flüssiger oder suspendierter Form, in
25 Form eines Elixiers oder als Kapseln verabreicht werden, vorzugsweise als Injektions- bzw. Infusionslösung. Bei den erfindungsgemäßen Formulierungen kann auf ein Adjuvans verzichtet werden, was besonders vorteilhaft ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich daher auf die
30 Verwendung der erfindungsgemäßen Formulierung als Injektions- oder Infusionslösung.

Injektionslösungen werden im allgemeinen dann verwendet, wenn nur relativ geringe Mengen einer Lösung bzw. Suspension, beispielsweise ca. 1 bis ca. 20 ml, dem Organismus zugeführt werden soll. Infusionslösungen werden im allgemeinen dann verwendet, wenn eine größere Menge einer Lösung oder Suspension, beispielsweise ein oder mehrere Liter, appliziert werden sollen. Da im Gegensatz zur Infusionslösung bei Injektionslösungen nur wenige Milliliter verabreicht werden, machen sich geringe Abweichungen vom pH-Wert und vom osmotischen Druck des Blutes bzw. der Gewebsflüssigkeit bei der Injektion nicht oder nur unwesentlich im Hinblick auf die Schmerzempfindung bemerkbar. Eine Verdünnung der erfindungsgemäßen Formulierung vor der Anwendung ist daher im allgemeinen nicht erforderlich. Bei der Applikation größerer Mengen sollte hingegen kurz vor der Applikation die erfindungsgemäße Formulierung so weit verdünnt werden, daß eine zumindest annähernd isotonische Lösung erhalten wird. Ein Beispiel einer isotonischen Lösung ist eine 0,9%-ige Natriumchloridlösung. Bei der Infusion kann die Verdünnung beispielsweise mit sterilem Wasser während der Applikation z.B. über einen sog. Bypaß erfolgen.

Die Figuren und die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

20

Beschreibung der Figuren

Fig. 1 zeigt eine E7-spezifische CTL-Antwort, die nach der Immunisierung mit 1 µg L1E7₁₋₆₀ CVLPs erzeugt wurden. Die isolierten Milzzellen von mit L1E7₁₋₆₀ CVLPs (gefüllte Zeichen) und HBS-Puffer (offene Zeichen) immunisierten Mäusen wurden einmal in vitro mit bestrahlten RMA-E7-Zellen stimuliert und nach fünf Tagen in einem Standard vier Stunden ⁵¹Cr-Freisetzungszytotoxitätstest mit folgenden Zielzellen getestet: RMA-E7-Zellen (Quadrate), E7₄₉₋₅₇ Peptid-beladene RMA-Zellen (dreieckig) und RMA-Zellen (Kreise). Die Ergebnisse sind als spezifische Lyse in % ausgedrückt.

Fig. 2 zeigt das Ergebnis eines Titrationstestes, durchgeführt mit einer E7-spezifischen CTL-Linie, die nach Vaccinierung einer C57BL/6-Maus mit 20 µg

L1E₁₋₆₀ CVLPs und dreimaliger in vitro Stimulation mit RMA-E7 Transfektanten erhalten wurde. Die Peptidkonzentration lag zwischen 100 pg und 1 µg/ml. Als Zielzellen wurden ⁵¹Cr-markierte E7 49-57 Peptid-beladene RMA-Zellen verwendet. Das Verhältnis von Zellen zu Zielzellen war 30:1.

Fig. 3 zeigt den Schutz von C57BL/6-Mäusen gegen das Wachstum von TC-1 Tumorzellen. Die Mäuse (5 pro Gruppe) wurden s.c. entweder mit 10 µg L1E₁₋₆₀ CVLPs (dreieckig), mit 10 µg L1ΔC VLPs (Kreise) oder mit HBS-Puffer (Quadrat) immunisiert. Zwei Wochen später wurden den Mäusen s.c. 6 × 10⁴ TC-1 Tumorzellen pro Maus in die linke Flanke inokuliert. Die Mäuse wurden zweimal pro Woche kontrolliert.

Fig. 4 zeigt die Verhinderung des Wachstums von TC-1 Tumor durch L1E₁₋₆₀. CVLPs. C57BL/6-Mäusen (5 pro Gruppe) wurden 6 × 10⁴ TC-1-Tumorzellen pro Maus in die linke Flanke inokuliert. Zwei Wochen später wurden die Mäuse mit einer s.c. Injektion von 10 µg L1E₁₋₆₀ CVLPs (Dreiecke), 10 µg L1ΔCVLPs (Kreise) oder HBS-Puffer (Quadrat) immunisiert.

Beispiele

1. Herstellung von chimären Genen kodierend für HPV16L1E7-Fusionsproteine

Der HPV-16L1 offene Leserahmen (ORF) wurde aus dem Plasmid HPV-16-114/k-L1/L2-pSynxtVI (Kirnbauer, R. et al. (1994) J. Virol. 67, 6929) mit der Restriktionsendonuklease BglII ausgeschnitten und in den Vektor pUC19 (New England Biolabs) in die BamHI-Stelle kloniert.

Zur Herstellung von HPV-16L1ΔC wurden zwei Primer konstruiert, die zu HPV-16L1 ORF komplementär sind. Der erste Primer hat die Sequenz
AAAGATATCTTGTAGTAAAAATTGCGTCCTAAAGGAAAC
und der zweite Primer
AAAGATATCTAATCTACCTCTACAAC TGCTAACGCAAAAACG.

Beide Primer kodieren 5' eine EcoRV Restriktionsenzymschnittstelle. In den stromabwärtsliegenden Primern folgt auf die EcoRV Stelle ein TAA Translationsstopkodon, um die letzten 34 Aminosäuren des HPV16L1 ORF zu deletieren. Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt, um den gesamten L1 ORF und den gesamten Vektor zu amplifizieren. Das lineare Produkt wurde mit EcoRV gespalten, mit T4 DNA-Ligase zirkularisiert und E.coli DH5 α -Zellen transformiert. Die Klone wurden auf die Anwesenheit einer EcoRV Stelle analysiert. Das erhaltene Konstrukt pUCHPV16L1 Δ C wurde benutzt, um den ORF von HPV16E7 1-50 in die EcoRV Stelle zu klonieren.

Zur Klonierung des Fragmentes wurden Primer mit einer 5'EcoRV Restriktionsenzymschnittstelle verwendet. Es wurde folgendes Primerpaar verwendet:

AAAAGATATCATGCATGGAGATAACACCTACATTGC
und
TTTGATATCGGCTCTGTCCGGTTCTGCTTGTCC.

Die PCR Produkte wurden mit EcoRV gespalten und in die EcoRV Stelle des modifizierten L1-Gens insertiert.

Zur Eliminierung der EcoRV Stellen wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt, um zwei überlappende Fragmente des Klons pUC-HPV16L1 Δ CE7 1-50 zu amplifizieren. Die resultierenden DNA-Fragmente überlappten an der Position der L1/E7 Grenze („Four Primer PCR“, Ho, S. N. et al (1989) Gene 77, 51). Jedoch enthielten die Primer nicht die zwei EcoRV Restriktionsenzymschnittstellen. Fragment 1 wurde mit den Primern P1 und P2 und Fragment 2 mit den Primern P3 und P4 hergestellt.

P1: GTTATGACATACATACATTCTATG (L1)
P2: CCATGCATTCCTGCTTGTAGTAAAAATTGCGTCC (E7)
P3: CTACAAGCAGGAATGCATGGAGATAACACC (E7)
P4: CATCTGAAGCTTAGTAATGGGCTCTGTCCGGTTCTG (E7)

Ein-Zehntel der gereinigten Produkte wurde gemischt und als Matrize in der PCR-Reaktion mit ausschließlich den Primern P1 und P4 benutzt. Das resultierende Produkt wurde mit EcoNI (L1) und HindIII (stromabwärts vom Stopkodon auf den Primer P4) gespalten und benutzt, um ein EcoNI/HindIII Fragment des klonierten HPV16L1 ORF zu ersetzen. Der resultierende Klon unterscheidet sich daher vom Klon HPV16L1ΔCE7 1-50 durch den Verlust der zwei internen EcoRV Restriktionsenzymeschnittstellen und der korrespondierenden nicht-HPV Aminosäuren Asp und Ile zwischen dem L1 ORF und E7 und stromabwärts von E7. Die erste EcoRV Stelle wurde durch die ursprünglichen L1 Aminosäuren an dieser Position ersetzt (AlaGly). Die zweite EcoRV Stelle wurde durch ein Translationsstopsignal ersetzt. Zusätzlich enthält dieser Klon (HPV16L1ΔC*E7 1-52) die ersten 52 Aminosäuren von HPV16E7. Klon HPV16L1ΔC*E7 1-52 wurde zur Herstellung der Klone HPV16L1ΔC*E7 1-55, 1-60 und 1-65 mit Hilfe des Primers P1 in Kombination mit P5, P6 und P7 verwendet.

P5: CATCTGAAGCTTATCAATATTGTAATGGGCTCTGTCCG (E7 1-55)

P6:

CATCTGAAGCTTACTTGCAACAAAAGGTTACAATATTGTAATGGGCTCT
20 GTCCG (E7 1-60)

P7:

CATCTGAAGCTTAAAGCGTAGAGTCACACTTGCAACAAAAGGTTACAA
TATTGTAATGGGCTCTGTCCG (E7 1-65).

25 HPV16L1ΔC*E7 1-70 wurde mit dem Klon HPV16L1ΔC*E7 1-65 und den Primern P1 und P8 hergestellt.

P8:

CATCTGAAGCTTATTGTACGCACAACCGAAGCGTAGAGTCACACTG

30

In allen Fällen wurden EcoNI und HindIII benutzt, um die korrespondierenden Fragmente zu ersetzen. Die Klone wurden durch DNA-Sequenzierung analysiert.

2. Herstellung von rekombinanten Baculoviren

Spodoptera frugiperda (Sf9) Zellen wurden als Monolayer oder in Suspensionskultur in TNM-FH Insektenmedium (Sigma, Deisenhofen) mit 10% fötalem Kälberserum und 2 mM Glutamin herangezogen. Rekombinante Baculoviren HPV16L1ΔCE7 1-x wurden durch Cotransfektion von 10 µg der rekombinanten Plasmide und 2 µg von linearisiertem Baculo-Gold DNA (Pharmingen, San Diego, CA) in Sf9 Zellen transfiziert. Rekombinante Viren wurden gemäß der Angaben des Herstellers gereinigt. Um die Expression zu testen, wurden 10^6 Sf9 Zellen mit rekombinantem Baculovirus und einer m.o.i. („multiplicity of infection“) von 5 bis 10 infiziert. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM Kcl, 8,1 mM Na₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2) gewaschen. Die Zellen wurden dann in SDS-Probenpuffer lysiert und durch SDS-Gelchromatographie und Immunoblotassay getestet.

20

3. Reinigung von virusähnlichen Partikeln

Für die Herstellung von CVLPs wurden Trichoplusia ni (TN) High Five-Zellen bei 27°C bis zu einer Dichte von 1-1,5 $\times 10^6$ Zellen pro ml in Ex-Cell 405 serumfreiem Medium gezüchtet (JRH, Biosciences, Lennexa, KS). Eine 400 ml Kultur wurde geerntet und mit einer m.o.i. von 2 bis 5 mit rekombinanten Baculoviren für eine Stunde mit periodischen Inversionen infiziert. Es wurden bis zu 240 ml Medium hinzugegeben und die Zellen wuchsen 3 bis 4 Tage lang. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und in 10 ml Extraktionspuffer resuspendiert (10 mM MgCl₂, 1-50 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 20 mM Hepes, 0,01% Triton (optional), pH 7,4) und für 45 Sekunden bei 60 Watt beschallt. Nach der Zentrifugation bei 10.000 rpm im Sorvall SS34 Rotor wurde das Pellet im 6 ml Extraktionspuffer gelöst, für 30 Sekunden bei 60 Watt beschallt und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden

kombiniert und auf einen Zweistufengradienten aus 40% (w/v) Succhrose und 57,5% (w/v) CsCl aufgebracht. Nach der Zentrifugation in einem SW-28 Rotor bei 27.000 rpm für zwei Stunden wurden die Interphase und die CsCl-Schicht gesammelt; auf eine CsCl-Dichte von 1,38 g/ml justiert und bei 45.000 rpm für 16 Stunden zentrifugiert. Die Gradienten wurden fraktioniert und jede Fraktion wurde durch Western Plot mit Anti-HPV16L1mAb Camvir1 (Pharlingen, San Diego, CA) getestet. Die reaktiven Fraktionen wurden vereinigt und über eine Ultrafiltration mit Centricon 30 Mikrokonzentratoren (Amicon Corp. Beverly, MA) gegen Hepes-Puffer (1 mM Hepes, 149 mM NaCl, 0,5 mM KCl, pH 7,2) dialysiert und die Anwesenheit von CVLPs mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie bestätigt. Die Konzentration von L1E7-Protein wurde in einem SDS-Gel, welches mit Coomassie blue angefärbt wurde, durch Vergleich mit BSA-Standards ungefähr bestimmt.

15

4. Kultivierung von Mauszellen

Die C57BL/6 abgeleiteten Mauszellen TC-1 sind primäre Lungenepithelzellen von C57BL/6-Mäusen, die durch Transfektion mit den Onkogenen HPV-16 E6 und E7 und c-Ha-ras (Lin , K.-Y. (1996), supra) transformiert wurden. RMA (Ljungrenn & Karre (1985) J. Exp. Med., 162, 1745-1757) und die prozessierungsdefekte Zelllinie RMA-S sind C57BL/6 Thymoma-Zellen. Die HPV-16 E7 transfizierte RMA-E7 ist in Speidel, K. et al. (1997) Eur. J. Immunol., 27(9), 2391-2399, beschrieben. Alle Zellen wurden in RPMI-1640, supplementiert mit 10% FCS, 2-ME, L-Glutamin und Antibiotika, kultiviert. 0,8 mg/ml G418 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) wurde für die Kultivierung von RMA-E7-Transfektanten hinzugegeben. TC-1-Zellen wuchsen zusätzlich in Anwesenheit von 0,4 mg/ml G418, 0,2 mg/ml Hygromycin und 1 mM Natriumpyruvat.

5. Herstellung von cytotoxischen T-Zell(CTL)-Linien

10-14 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzzellen präpariert, $2-4 \times 10^7$ Milzzellen wurden mit 10^5 bestrahlten (200 Gy) syngenen RMA-E7-Transfektanten pro ml cokultiviert. Nach 5 Tagen wurde der erste ^{51}Cr -Freisetzungscytotoxizitätstest durchgeführt. Für die Herstellung von CTL-Linien wurden die Milzzellen wöchentlich in 24-Lochplatten mit 2×10^5 bestrahlten RMA-E7-Transfektanten pro Loch als Stimulatorzellen und 5×10^6 bestrahlten (33 Gy) C57BL/6 Milzzellen pro Loch als Feederzellen restimuliert.

6. ^{51}Cr -Freisetzungscytotoxizitätstest

15 Für den ^{51}Cr -Freisetzungscytotoxizitätstest wurden Effektor-T-Zellen zu 1×10^4 ^{51}Cr -markierten Zielzellen pro Loch auf einer 96-Lochplatte mit unterschiedlichen Effektorzell zu Zielzellverhältnis (E:T) hinzugegeben. Die Zielzellen wurden mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (100 μCi pro 2×10^6 Zellen) für eine Stunde bei 37°C markiert. Das Peptid mit der Sequenz RAHYNIVTF (Aminosäure 49-57 von HPV-16 E7; Feltkamp, M.C.W. et al. (1993), Eur. J. Immunol., 23, 2242-2249) wurde während dieser Inkubation in einer Konzentration von 50 μM hinzugegeben. In dem Peptidtitrationsstest mit einem konstanten E:T-Verhältnis wurden die ^{51}Cr -markierten Zielzellen mit abnehmenden Peptidkonzentrationen (1 μg - 100 pg pro ml) für eine Stunde bei 37°C kultiviert bevor die Effektorzellen hinzugegeben wurden. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C , wurden 50 μl des Überstandes pro Loch auf eine Lumaplatte (Packard) transferiert und getrocknet. Die Radioaktivität wurde in einem β -Zähler (Trilux Microbeta, Wallac) gemessen. Die mittlere spezifische Lyse wurde gemäß folgender Formel berechnet: % spezifische Lyse = (experimentelle Freisetzung - spontane Freisetzung)/(vollständige Freisetzung - spontane Freisetzung) $\times 100$.

7. Induktion von E7-spezifischen cytotoxischen T-Lymphozyten durch CVLPs

Es wurden 11 sechs bis sechzehn Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse mit 1-20 µg CVLPs ohne Adjuvans durch eine einfache s.c. Injektion immunisiert. Zwei Wochen später wurden die Milzzellen präpariert und mit HPV-16 E7 exprimierenden Transfektanten der C57BL/6 abgeleiteten Tumorzelllinie RMA (RMA-E7) als Stimulatorzellen in vitro stimuliert. Nach fünftägiger Kultivierung wurde der erste Zytotoxizitätstest durchgeführt.

Die Stimulation der Milzzellen wurde in wöchentlichen Intervallen wiederholt. Wie in Fig. 1 gezeigt, führte die Immunisierung mit 1 µg von L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs, d.h. die Carboxy-terminalen 34 Aminosäuren von HPV-16 L1 wurden durch die Aminosäuren 1-60 von HPV-16 E7 ersetzt, zu einer starken E7-spezifischen CTL-Antwort.

Insgesamt wurde nach fünf Tagen eine spezifische Lyse von RMA-E7 Transfektanten zwischen 7,7% und 54,7% (Mittelwert 33,6%; E:T-Verhältnis 8:1-33:1) beobachtet. Die durchschnittliche Lyse nach der zweiten Stimulation war zwischen 35,8% und 57,8% (Mittelwert 45,3%; E:T-Verhältnis 8:1-44:1). Wenn die Mäuse nur mit 1 µg L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs immunisiert wurden, wurde durchschnittlich nach 5 Tagen Kultivierungszeit eine geringere Reaktivität von E7-spezifischen CTLs beobachtet (7,7-49,5%; Mittelwert 28,5%) als nach Immunisierung mit 5 µg (17,2-44,7%; Mittelwert 33,9%) oder 20 µg (26,0-54,7%; Mittelwert 38,5). Die Milzzellen von den Kontrollmäusen (vakziniert mit HBS-Puffer) zeigten keine E7-spezifische Reaktivität nach fünf Tagen (0,3 - 8,9%, Mittelwert 3,4%, E:T-Verhältnis 4:1-9:1).

L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLP enthält ein bekanntes H2-D^b-T-Zellepitop des E7-Proteins (E7₄₉₋₅₇, Feltkamp, M.C.W. et al. (1993), supra). Um die erhaltene E7-Spezifität der CTLs zu bestätigen, wurden sie daher gegen RMA-Zellen getestet, die mit dem Peptid E7₄₉₋₅₇ beladen sind. CTLs, die RMA-E7 Transfektanten erkennen, zeigten eine spezifische zytotoxische Aktivität gegen E7₄₉₋₅₇ RMA oder RMA-S Zielzellen. Die gemessene spezifische Lyse variierte zwischen 21,2-25% nach fünf Tagen (E:T-Verhältnis 8:1-15:1, s. Fig. 1). In dem durchgeföhrten Peptidtitrationstest

wurden nach der dritten Stimulation RMA-S Zellen nach Beladung mit E7₄₉₋₅₇ bei einer Konzentration von 1 µg/ml zu 70,5% bzw. 71,4% (zwei CR-Linien wurden getestet) lysiert (E:T-Verhältnis 40:1, s. Fig. 2). Sogar wenn RMA-S-Zellen mit so wenig wie 100 pg pro ml von E7₄₉₋₅₇ Peptid versehen würden, würde eine spezifische Lyse von 36,2% und 47,2% erhalten. CTLs, welche mit einem Kontrollpeptid, d.h. dem Influenzavirus-Nucleoprotein-abgeleiteten Peptid mit den Aminosäuren 366-374, die ein D^b-CTL-Epitop repräsentieren, beladen sind, wurden nicht erkannt. Milzzellen, die aus C57BL/6-Mäusen nach Behandlung mit L1ΔCE7₁₋₅₅ CVLPs (E7-Sequenz um fünf Aminosäuren verkürzt) isoliert wurden, erkannten nicht RMA-E7-Zellen, sogar wenn die Mäuse mit einer ansteigenden Dosis bis zu 250 µg vakziniert wurden.

Aus diesen Daten wird geschlossen, daß die CTLs durch L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs induziert wurden, E7-spezifisch sind und das Peptid E7₄₉₋₅₇ mit hoher Affinität erkennen. In einer FACS-Analyse von repräsentativen CTL-Linien wurden die CTLs als CD8-positiv typisiert.

8. Verhinderung des Wachstums eines syngenen E7-exprimierenden Tumors in C57BL/6 Mäusen

Um zu bestimmen, ob die Vaccinierung mit L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs eine effektive Immunität gegen syngene Tumorzellen (TC-1, Lin, K-Y. (1996), Cancer Res. 56, 21-26) induzieren, wurden Tumorschutzexperimente durchgeführt. C57BL/6 Mäuse (3-5 pro Gruppe) erhielten 1 s.c. Injektion von 10 µg L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs, 25 10 µg L1ΔCE7₁₋₅₅ CVLPs, 10 µg L1ΔC VLPs oder ein äquivalentes Volumen an HBS-Puffer ohne Adjuvans. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurden den Mäusen 6 x 10⁴ TC-1 Zellen, suspendiert in 200 µl PBS, in die linke Flanke inokuliert. 2 Monate lang wurde die Tumorgröße zweimal pro Woche gemessen bis die Mäuse getötet wurden.

Die Ergebnisse aller Experimente sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Die gesamte Tumoranwachsesrate in den Mäusen, die mit HBS-Puffer, L1ΔC VLPs oder L1ΔCE7₁₋₅₅ CVLPs vakziniert wurden, war durchschnittlich 80,5%. Die

Vaccinierung mit L1ΔC CVLPs schützte nicht gegen den Tumor, obwohl ein verzögertes Tumorwachstum beobachtet wurde (s. Fig. 3). Dagegen schützte die Vaccinierung von Mäusen mit L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs gegen Tumorwachstum: nur eine Maus (1/13) entwickelte einen kleinen, langsam wachsenden Tumor nach 38 Tagen, welcher innerhalb einer zweimonatigen Periode zurückging.

Milzzellen von HBS- oder L1ΔC-VLP-vaccinierten Mäusen, welche TC-1 Tumore entwickelten, zeigten keine oder nur geringe Levels einer E7-spezifischen CTL-Antwort, unabhängig davon, ob die Mäuse Tumore entwickelt hatten oder nicht.

Nach der 2. Stimulation wurde eine E7-spezifische Lyse von RMA-E7 Zielzellen zwischen 0-21% in tumortragenden Mäusen (Mittelwert 14%, E:T-Verhältnis 5:1-24:1), und zwischen 0 und 22,2% (Mittelwert 10,4%, E:T-Verhältnis 7:1-40:1) in tumorfreien Mäusen beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden in Mäusen, welche nach Immunisierung mit CVLP L1ΔCE7₁₋₆₀ vom Tumorwachstum geschützt wurden, eine E7-spezifischen CTL-Antwort zwischen 29,1 und 49,8% (Mittelwert 36,9%, E:T-Verhältnis 11:1-24:1) nach der 2. Stimulation festgestellt.

Weiterhin wurde analysiert, ob die Vaccinierung zu einer Regression von bereits existierenden Tumoren führt. Zwei Wochen nach der Inokulation von 6×10^4 TC-1-Zellen (s.c.) erhielten die Mäuse (5 pro Gruppe) eine einzige Injektion von 10 µg L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs, 10 µg VLP L1ΔC oder HBS-Puffer ohne Adjuvans. In diesem Experiment (s. Fig. 4) war die Tumorentwicklung von Kontrollmäusen, die entweder mit HBS behandelt oder mit VLP L1ΔC immunisiert wurden, nur 60% (3 von jeder Gruppe, 6/10). Jedoch generierten alle Mäuse (5/5), die mit L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs vakziniert wurden, eine Immunantwort gegen die etablierten Tumore und blieben zwei Monate lang nach der Tumorzellinjektion tumorfrei.

5 Patentansprüche

1. Arzneimittel zur Vermeidung oder Behandlung von humanem Papillomavirus (HPV)-spezifischem Tumor enthaltend mindestens ein Fusionsprotein aus mindestens einem L1-Protein eines oder mehrerer Papillomaviren und mindestens einem E-Protein eines oder mehrerer Papillomaviren und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein keine Papillomavirus-unspezifischen Epitope enthält.
- 15 2. Arzneimittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Tumor ein Larynx-, Cervix-, Penis-, Vulva- oder Analcarcinom ist.
3. Arzneimittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel kein Adjuvans enthält.
- 20 4. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß der Zusatz- oder Hilfsstoff ca. 0,3 bis ca. 4 M, vorzugsweise ca. 0,4 bis ca 3 M, insbesondere ca. 0,5 bis 2 M, vor allem ca. 1 bis ca. 2 M eines Salzes mit einem pH-Wert von ca. 7,3 bis ca. 7,45, vorzugsweise ca. 7,4 ist.
- 25 5. Arzneimittel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz ein Alkali- oder Erdalkalisalz ist, vorzugsweise ein Halogenid oder Phosphat, insbesondere ein Alkalihalogenid, vor allem NaCl und/oder KCl.
- 30 6. Arzneimittel nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert mit einem Puffer eingestellt wird, vorzugsweise mit einem Phosphat-Puffer, Tris-Puffer, HEPES-Puffer oder MOPS-Puffer.
- 35 7. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß das L-Protein ein deletiertes L-Protein ist, vorzugsweise ein deletiertes L1- und/oder L2-Protein.

8. Arzneimittel nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das L-Protein ein C-terminal deletiertes L-Protein ist, insbesondere ein C-terminal deletiertes L1-Protein.
9. Arzneimittel nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß bis zu ca. 35 Aminosäuren vom L-Protein deletiert sind, vorzugsweise ca. 25 bis ca. 35 Aminosäuren, insbesondere ca. 32 - 34 Aminosäuren.
10. 10. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß das E-Protein ein deletiertes E-Protein ist, vor allem ein deletiertes E6- und/oder E7-Protein.
11. 15. Arzneimittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das deletierte E-Protein ein C-terminal deletiertes E-Protein ist, vorzugsweise ein C-terminal deletiertes E7-Protein.
12. 20. Arzneimittel nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß bis zu ca. 55 Aminosäuren deletiert sind, vorzugsweise ca. 5 bis ca. 55 Aminosäuren, insbesondere ca. 38 bis ca. 43 Aminosäuren.
13. 25. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein in Form eines Capsids und/oder Capsomers vorliegt.
14. 30. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, daß das HPV ausgewählt ist aus HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-42, HPV-45, HPV-52 und/oder HPV-58.
15. Arzneimittel nach Anspruch 14 in Form einer Kombinationsvakzine, dadurch gekennzeichnet, daß die Papillomaviren ausgewählt sind aus HPV-16 und HPV-18 oder HPV-18, HPV-31, HPV-45 und HPV-58 oder HPV-6 und HPV-11.

16. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein ein L1ΔCE7_{1-x}-Fusionsprotein, vorzugsweise in Form eines CVLP, insbesondere von HPV-16 ist, wobei x eine ganze Zahl von 55 bis einschließlich 60 bedeutet.
5
17. Arzneimittel nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein ein L1ΔCE7₁₋₅₅- oder L1ΔCE7₁₋₆₀-Fusionsprotein ist.
18. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 1-17, dadurch gekennzeichnet, daß eine Zelle enthaltend einen Expressionsvektor, der für das genannte Fusionsprotein kodiert, unter geeigneten Bedingungen kultiviert, das Expressionsprodukt isoliert wird und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und Hilfsstoffe zugesetzt werden.
10
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Expressionsvektor keine Nukleinsäuresequenzen enthält, die das genannte Fusionsprotein bei der Expression um weitere Aminosäuren verlängern.
15
20. Verwendung eines Fusionsproteins gemäß einem der Ansprüche 1 und 7-17 zur Herstellung eines Arzneimittels einerseits zur Verhinderung von HPV-spezifischen Tumoren und andererseits zu Regression von bereits bestehenden HPV-spezifischen Tumoren.
20

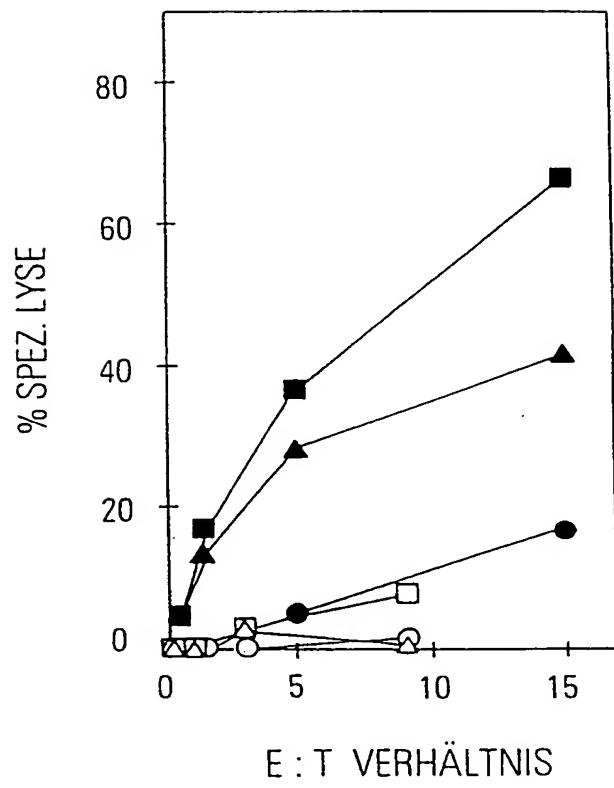
FIG.1

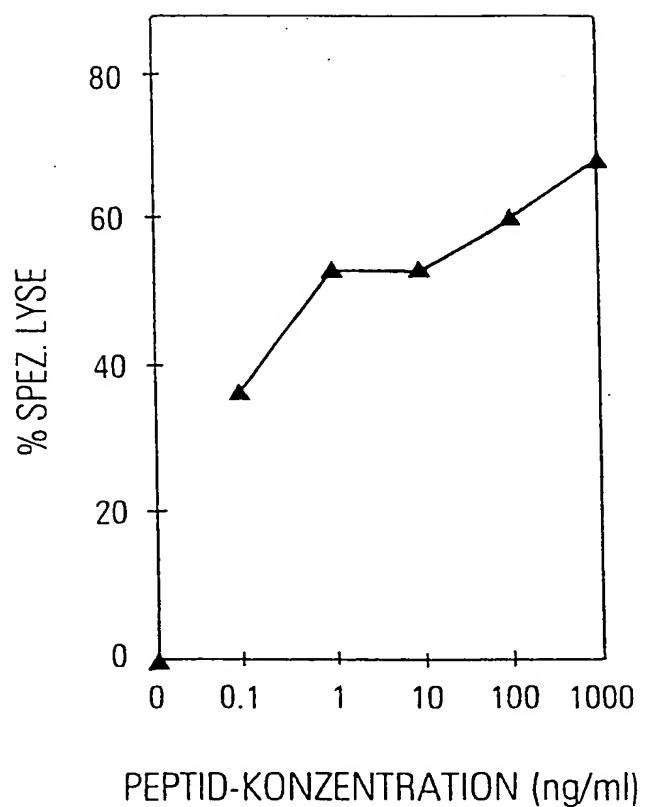
FIG.2

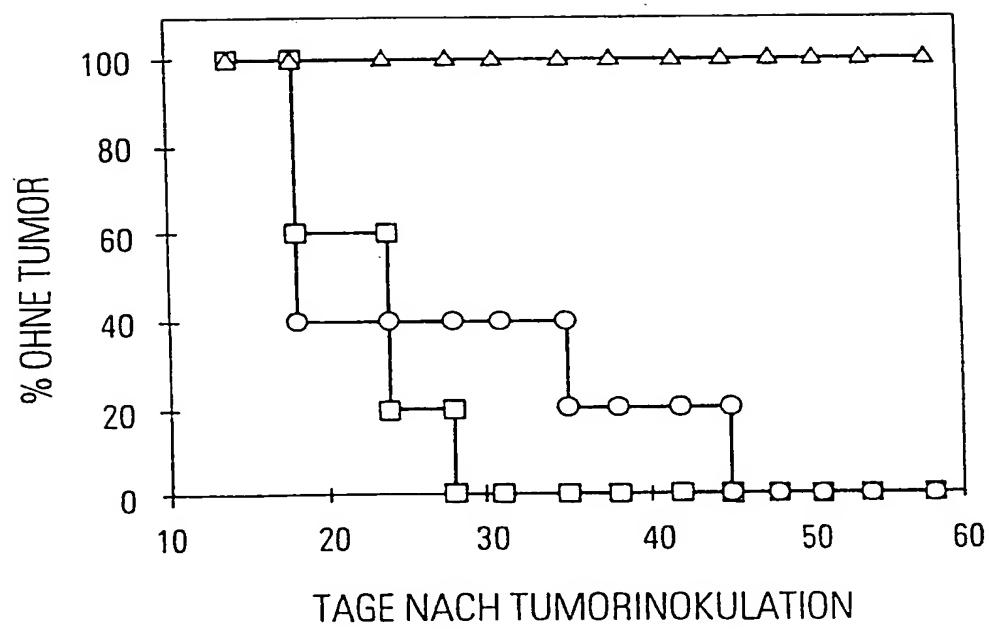
FIG. 3

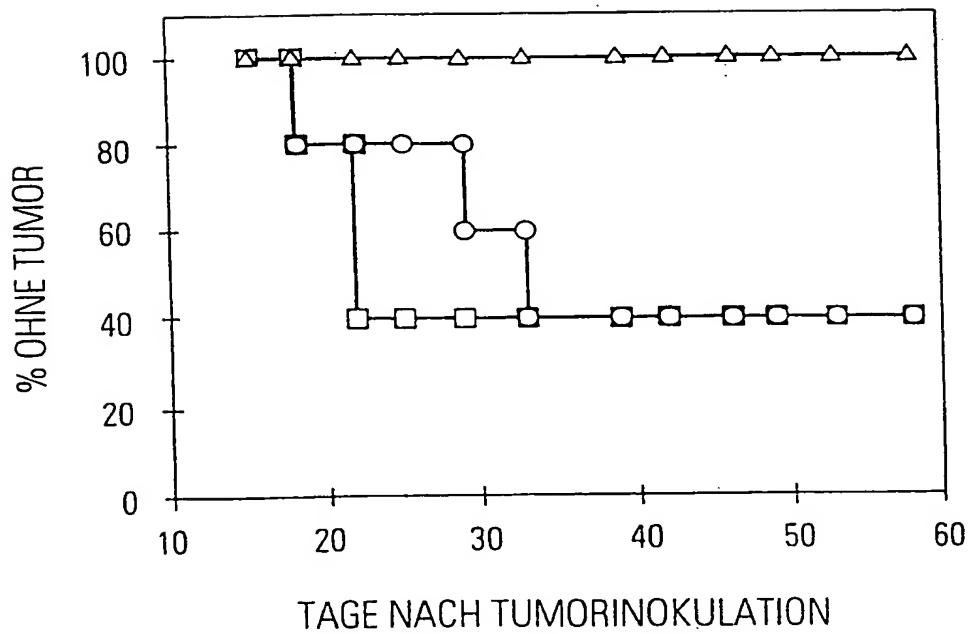
FIG.4

TABELLE 1

TUMOR PROTEKTION NACH IMMUNISIERUNG MIT L1 Δ CE7₁₋₆₀CVLPs

VAKZINE	ANZAHL MÄUSE	ANZAHL TUMORE
HS - PUFFER	18	16
L1 Δ C VLPs	13	11
L1 Δ CE7 ₁₋₅₅ CVLPs	10	7
L1 Δ CE7 ₁₋₆₀ CVLPs	13	1

SEQUENZPROTOKOLL

5 (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: MediGene Aktiengesellschaft
(B) STRASSE: Lochhamer Straße 11
10 (C) ORT: 82152 Martinsried/München
(D) BUNDESLAND:
(F) POSTLEITZAHL: 82152

15 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Arzneimittel zur Vermeidung oder Behandlung von Papillomavirus-spezifischem Tumor

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(E) LAND: Deutschland

20 (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: WINDOWS 3.1

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1

30 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 40
(B) ART: Nucleotidsequenz
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: DNA-Primer

40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1

AAAGATATCT TGTAGTAAAA ATTGCGTCC TAAAGGAAAC

40

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 44
(B) ART: Nucleotidsequenz
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: DNA-Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2

5 AAAGATATCT AATCTACCTC TACAAC TGCT AACCGCAAAA AACG

44

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: DNA-Primer

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3

25 AAAAGATATC ATGCATGGAG ATACACCTAC ATTGC

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: DNA-Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4

40 TTTTGATATC GGCTCTGTCC GGTTCTGCTT GTCC

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5

45

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

50

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: DNA-Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5

GTTATGACAT ACATACATTCTATG

24

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: DNA-Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6

CCATGCATTC CTGCTTGTAG TAAAAAATTTG CGTCC

35

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: DNA-Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7

35 CTACAAGCAG GAATGCATGG AGATACACC

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: DNA-Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8

CATCTGAAGCTTAGTAATGG GCTCTGTCCGGTTCTG

36

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: DNA-Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9

CATCTGAAGC TTATCAATAT TGTAATGGGC TCTGTCCG

38

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 54
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: DNA-Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10

CATCTGAAGC TTACTTGCAA CAAAAGGTTA CAATATTGTA ATGGGCTCTG TCCG 54

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 69
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: DNA-Primer

40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11

CATCTGAAGC TTAAAGCGTA GAGTCACACT TGCAACAAAA GGTTACAATA

TTGTAATGGG CTCTGTCCG

69

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 47
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: DNA-Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12

15 CATCTGAAGC TTATTGTACG CACAACCGAA GCGTAGAGTC ACACTTG

47